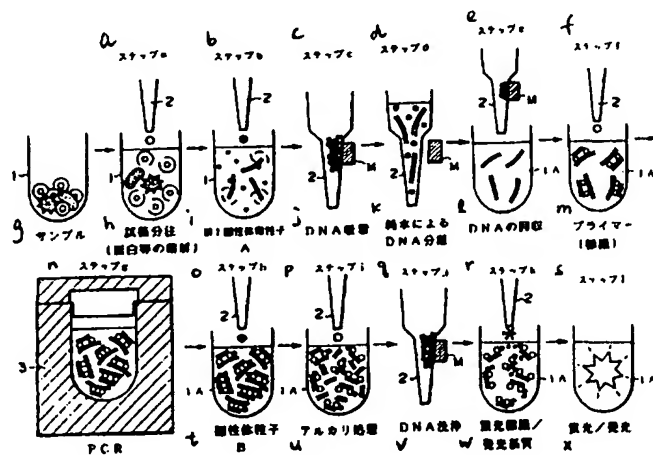


<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/10, C12Q 1/02, 1/68, 1/70, G01N 33/53, B03C 1/015, C12N 13/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/31105</p> <p>(43) 国際公開日 1997年8月28日(28.08.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00515</p> <p>(22) 国際出願日 1997年2月24日(24.02.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/63816 1996年2月25日(25.02.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) プレジジョン・システム・サイエンス株式会社 (PRECISION SYSTEM SCIENCE CO., LTD)[JP/JP] 〒206 東京都稲城市矢野口1843-1 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 田島秀二(TAJIMA, Hideji)[JP/JP] 〒206 東京都稲城市矢野口1843-1 プレジジョン・システム・サイエンス株式会社内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 土橋 皓(DOBASHI, Akira) 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目17番3号 第12森ビル6階 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, FI, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, SG, US, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, IT, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 補正書・説明書</p>	

(54) Title: METHOD FOR TREATING BIOPOLYMERS, MICROORGANISMS OR MATERIALS BY USING MORE THAN ONE TYPE OF MAGNETIC PARTICLES

(54) 発明の名称 複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法



n ... Step g
o ... Step h
p ... Step i
q ... Step j
r ... Step k
s ... Step l
t ... Second magnetic particles B
u ... Alkaline treatment
v ... Washing of DNAs
w ... Fluorescent labelling/luminescent substrate
x ... Fluorescence/luminescence

a ... Step a
b ... Step b
c ... Step c
d ... Step d
e ... Step e
f ... Step f
g ... Sample
h ... Dispensing of reagent (dissolution of protein or the like)
i ... First fine magnetic particles A
j ... Adsorption of DNAs
k ... Separation of DNAs by using pure water
l ... Recovery of DNAs
m ... Primer (labelling)

(57) Abstract

A method for treating biopolymers, microorganisms or materials by using more than one type of magnetic particles, wherein at least two types of magnetic particles are used in combination to permit a series of steps, such as extraction, isolation or assay of DNAs or the like, in an automatic, continuous manner and, at the same time, ensure complete prevention of cross-contamination. This method comprises bonding a biopolymer, a microorganism, or a material to magnetic particles by utilizing a pipette tip detachably mounted on the top of a pipette tip detachably mounted on the top of a pipette nozzle in a dispenser, conducting purification treatments such as capture of cells, lysis of cell nuclei, or dissolution of proteins to extract DNAs or the like, optionally amplifying the extracted DNAs or the like, isolating a particular DNA or the like by taking advantage of other magnetic particles coated with an antibody, probe, biotin, or streptavidin by utilizing the pipette tip, and assaying the isolated particular DNA or the like by taking advantage of chemoluminescence, fluorescence or a color reaction.

(57) 要約

本発明は、少なくとも2種類以上の磁性体粒子を組み合わせること
 とでDNA等の抽出、単離若しくは測定等の一連の作業を自動的に、
 かつ、一貫して達成することができ、しかも、完全なクロスコン
 タミネーションの防止を保障することができる複数種類の磁性体粒
 子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法を提供する。

本発明は、生体高分子、微生物若しくは物質を、分注機のピペッ
 トノズル先端部に着脱自在に装着されたピペットチップを利用して
 磁性体粒子と結合させて、細胞の捕獲、細胞核溶解若しくは蛋白質
 溶解等の精製処理を行なうことで、DNA等を抽出し、次に、抽出
 されたDNA等を必要に応じ増幅させた後、ピペットチップを利用
 して抗体、プローブ、ビオチン又はストレプトアビジンがコーティ
 ングされた他の磁性体粒子で特定のDNA等を単離させ、次に、こ
 の単離された特定のDNA等を化学発光若しくは蛍光或は呈色反応
 を利用して測定するように構成する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	EF	スペイン	LS	レソト	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SK	スロバキア共和国
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TD	チャド
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	VI	ヴィエトナム	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IT	イタリア	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CC	中東	JP	日本	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CG	コンゴ	KE	ケニア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KR	韓国	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コートジボワール	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	米国
CO	コロンビア	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
DE	ドイツ	LK	スリランカ	PL	ポーランド	YU	ユーゴスラビア
DK	デンマーク			PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

明 細 書

複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の
処理方法

5 技術分野

この発明は、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス、細菌若しくは細胞等の生体高分子、微生物若しくは物質（以下、「DNA等」という。）の処理作業に必要な細胞の捕獲、細胞核の溶解、蛋白質の溶解、DNA等の抽出、DNA等の単離およびDNA等の標識、測定又は回収等の作業を、自動的に行なうことを可能とする複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法に関する。

技術の背景

近年、DNA等の研究は、工学分野や医学分野、農学分野、理学分野、薬学分野等、あらゆる分野で行なわれており、その目的は、ゲノムシーケンシング、臨床診断、農植物品種改良、食品菌検査、創薬システム等、様々である。

このように非常に適用分野が広く、また、その応用が期待されるDNA等の解析は、従来、遠心分離法、高速液体クロマト法、ゲル電気泳動法、ディスポカラム法、透析法、ガラスパウダー法、磁性体微粒子洗浄ノズル法若しくは免疫血清反応等、多種の方法で行なわれている。

しかしながら、上記遠心分離法の場合には、容器の自動装填および取り出しの自動化が非常に難しく、また、遠心後、上清・沈澱の分画を機械的行なうことが非常に難しく、汎用性に乏しい、という問題を有していた。

また、高速液体クロマト法の場合、分離カラムが基本的に消耗部品となるので、該カラムへの試料のインジェクションや分離時間管理が機械化できず、また、同じカラム内を通過するので、コンタミ

ネーションを完全に防止することができない、という問題を有していた。

さらに、ゲル電気泳動法の場合、ゲルの調整を機械化することができず、DNAの分離は基本手法として一般的ではあるが、その分離断片を取り出すのは用手法により行なわざるを得ない、という問題

5 問題を有していた。

一方、ディスポカラム法は、特定のDNA断片を取り出すためキット化される一つの手法であるが、コストが非常に高く、また、使用範囲も狭い。しかも、分注・カラム通過液をコントロールしにく

10 く、機械化には解決すべき問題が多々ある、という問題を有していた。

また、透析法は、透析に時間がかかり、また、少量対応がしにくいので、あまり用いられてはいない。

ガラスパウダー法は、二酸化珪素の物質を利用したDNAの優れた抽出法で、工程は簡便になるが、フィルターか遠心分離によりパウダーを分離するため、全自動化しにくい、という問題を有していた。

15 た。

さらに、磁性体微粒子洗浄ノズル法は、磁性体によりシリンダーと吸引・吐出制御で自動化できるが、ノズルの洗浄方式では基本的にコンタミネーションを解決することができない、という問題を有

20 していた。

また、免疫血清反応には、通常液相法と固相法とが用いられるが、液相法においては、前記遠心分離法と同様の問題点があり、また、固相法においても、遠心分離法と同様の問題点や固相担体から解

25 離するための多種類フィルタが必要であり全自動しにくく多種類の固相担体を用いる方法が困難で非特異結合を回避する適当な手段がなく、高感度・特異的分析に限界があるという問題を有していた。

この発明は、かかる現状に鑑み創案されたものであって、その目

的とするところは、第 1 に、少なくとも 2 種類以上の磁性体粒子を組み合わせるだけで、細胞の捕獲、細胞核の溶解、蛋白質の溶解、DNA 等の抽出、DNA 等の単離および DNA 等の標識・測定等の一連の作業を自動的に、かつ、一貫して達成することができる DNA 等の処理方法を提供することを目的とする。第 2 には、この第 1 の原理と本出願人が先に提案した「分注機を利用した磁性体の脱着制御方法およびこの方法によって処理される各種装置」（特願平 7-39425 号）の原理とを組み合わせることで、さらに効率的な DNA 等の全自動解析を達成することができ、しかも、完全なクロスコンタミネーションの防止を保障することができる理想的な DNA 等の処理方法を提供することを目的とするものである。第 3 には、2 種類以上の磁性体粒子を制御することで、濃縮、攪拌、遠心分離、透析等の処理をも含め一貫して行うことのできるため、装置規模を縮小化しコストを削減することができる DNA 等の処理方法を提供することを目的とするものである。第 4 には、複数種類の磁性体粒子を使い分けて、各作業工程で最適な磁性体粒子を選択することによって、多くの作業工程からなる種々の処理を、効率良く、信頼性良く、且つ、確実に、迅速に実行できるとともに、多様性及び汎用性が高い。

20

発明の開示

上記目的を達成するため、第一の発明に係る複数種類の磁性体粒子を用いる DNA 等の処理方法にあつては、細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス、若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出、回収、単離、増幅、標識、分析又は測定等の作業からなる処理を、その作業目的に適合した複数種類の磁性体粒子を利用して自動的に行なうものである。

ここで、「処理」とは、捕獲、抽出、回収、単離、増幅、標識、分析又は測定等の作業を含む。「生体高分子」は、生体内で合成さ

れる高分子物質であって、タンパク質、核酸（DNA，RNA，mRNA等）、多糖等を含む。タンパク質には免疫物質も含む。「微生物」には、ウィルス、プラスミド、細菌、細胞等を含む。「物質」には、生体高分子以外の分子生物学的物質を含む有機又は無機の
5 化学物質を含む。「複数種類」には、例えば、磁性体粒子の大きさ、形状、素材、物性、多孔性の有無等の表面の性質、若しくは付着・結合物質又はコーティング物質の相違による種類がある。

「作業目的に適合した複数種類の磁性体粒子を利用して行う」やりかたとしては、作業対象物質を直接又は他の物質を介して間接に
10 磁性体粒子に結合させ、磁性体粒子に磁場を及ぼすことによって磁性体粒子を、例えばピペット手段によって分離して、残液を除去したり、又は磁性体粒子自体を除去したり、磁場を解除することによって該磁性体粒子を液中に懸濁させて目的物質を捕獲したり、目的物質をすること又はこれらの組み合わせや繰り返しによって行われ
15 る。したがって、作業の内容によっては、先行する作業で用いた磁性体粒子の除去を条件に同一の新たな磁性体粒子を用いても良い。

複数種類の磁性体粒子を用いることによって、各作業で最適な磁性体粒子を選ぶことができるので各作業の効率や信頼性を高めると
20 ともに、一連の作業からなる複雑な処理を自動的に一貫して、迅速に行うことができ、且つ、先行する作業で残存する不要な物質を、洗浄等によらずに除去することができるので、高精度で信頼性のある処理を行うことができる。

前記磁性体粒子に磁場を及ぼすには、例えば、磁性体粒子にピ
25 ヱット手段の先端部と貯溜部とを結ぶ液通路内に液の吸引又は吐出によって磁性体粒子を懸濁させた液を通過させる際に液通路の外側面から行う。これによって、液から磁性体粒子を効率良く分離して、濃縮、捕獲、抽出、回収、単離等を行うことができる。

「自動的」とは、作業の内容、順序に応じて、例えば、ピペット

手段の吸引、吐出、その回数の指示、必要な試料や必要な各種類の磁性体粒子を含有する容器の位置の指定、使用済みの磁性体粒子の廃棄、容器の移送、磁場を及ぼすのか及ぼさないかの指示、インキュベーションの時間等を予めプログラム化し、信号により分注機や

5 容器移送機、磁石等に指示を与えることにより行う。

第二の発明は、第一の発明において、前記細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出、回収、単離、増幅、標識、分析又は測定等の作業からなる処理は、分注機のピペットノズル先端部

10 に着脱自在に装着されたピペットチップで行なうものである。

これによって、ピペットチップの洗浄を行わなくても、クロスコンタミネーションなしで、効率よく迅速に処理を行うことができる。

第三の発明は、第二の発明において、前記ピペットチップは、試

15 料の吸引若しくは吐出と磁石の接離制御により生体高分子、微生物或は特定の物質が結合した磁性体粒子を捕獲、抽出、回収、単離、増幅、標識、分析又は測定等の各作業工程間の移送を行うものである。

「結合」には、例えば、磁性体粒子自体への付着、磁性体粒子に

20 コーティングされた所定物質への吸着、接着、又は反応物質による反応等によって磁性体粒子に結び付ける場合を含む。

第四の発明は、細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質を、分注機のピペットノズル先端部に着脱自在に装着されたピペットチップ

25 プを利用して磁性体粒子に結合させて、細胞の捕獲、細胞核溶解若しくは蛋白質溶解等の精製処理を行なうことで、DNA、RNA若しくはmRNAを抽出し、次に、プローブ或はビオチン若しくはストレプトアビジンがコーティングされた他の磁性体粒子が特定の塩基配列断片を単離させるものである。ここで、遺伝子の本体とされ

る核酸が糖とリン酸からなる鎖状化合物の糖に、窒素を含んだ複素環式化合物がグリコシド結合した構造をとっているが、この複素環式化合物であるチミン（T）、シトシン（C）、アグニン（A）、グアニン（G）を「塩基」としている。

- 5 第五の発明は、第一の発明乃至第四の発明のいずれかにおいて、前記複数の磁性体粒子を利用した細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出、回収、単離、増幅、標識、分析又は測定等の各作業工程には、免疫反応又は相補的DNA等の特異的親和性物質を介して行うものである。

第六の発明は、第四の発明において、前記複数の磁性体粒子を利用した細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出若しくは単離作業工程の間に、DNA、RNA若しくはmRNA等の増幅工程を組み入れたものである。

ここで、「DNA、RNA若しくはmRNA等」には、これらを形成する塩基配列断片をも含む。

- 第七の発明は、第四の発明乃至第六の発明のいずれかにおいて、前記複数の磁性体粒子を利用した細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出若しくは単離作業工程の後に、単離された特定の塩基配列断片等の生体高分子、微生物若しくは物質を化学発光や蛍光若しくは酵素呈色にて、その特定の塩基配列断片等の有無、生体高分子、微生物若しくは物質を免疫反応等を介して測定するものである。

第八の発明は、第四の発明乃至第六の発明のいずれかにおいて、細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質を、分注機のピペットノズル先端部に着脱自在に装着されたピペットチップを利用して磁性

- 体粒子に結合させて、細胞の捕獲、細胞核溶解、蛋白質溶解若しくは免疫反応等の精製処理を行なうことで、DNA、RNA若しくはmRNA等を抽出し、次に、必要に応じ抽出されたDNA、RNA若しくはmRNAについては増幅させた後、ピペットチップを利用して抗体、プローブ、ビオチン若しくはストレプトアビジンがコーティングされた他の磁性体粒子で特定のDNA、RNA若しくはmRNA等を単離させ、次に、この単離された特定のDNA、RNA若しくはmRNA等を、化学発光、蛍光若しくは酵素呈色にて、その特定の塩基配列断片等の有無や量を測定するものである。
- 5 第九の発明は、試料中に第1磁性体粒子をピペット手段により混合又は攪拌させることによって試料中の目的物質を第1磁性体粒子に結合させて捕獲する工程と、目的物質が捕獲された第1磁性体粒子をピペット手段によって分離し、その残液を除去する工程と、磁性体粒子から前記目的物質を解離するための解離用液と前記第1磁性体粒子を混合又は攪拌することによって目的物質を第1磁性体粒子から解離させる工程と、該第1磁性体粒子を除去する工程と、ピ
15 ペット手段による混合又は攪拌によって該目的物質を第2磁性体粒子に結合させて捕獲する工程と、目的物質が捕獲された第2磁性体粒子をピペット手段により分離する工程とを少なくとも含むものである。
- 20 ある。

ここで、「目的物質」には、生体高分子、微生物若しくは物質を含む。

- 本発明に記載された工程以外の工程の挿入を排除するものではなく、例えば、目的物質の加工や標識化する工程が、目的物質の解離
25 前又は解離後に付け加えられても良い。したがって、目的物質は、工程の進展とともに変化しうる。

「ピペット手段による分離」は、例えばピペット手段が吸引又は吐出する際に、ピペット手段の内部に磁場を及ぼすことによって、ピペット手段の内部に磁性体粒子を吸着させることによって行う。

本発明では、複数種類の磁性体粒子を取り替えて用いることによって、先行する工程で使用された種々の不要の物質を除去しつつ次の工程に進むことができる。したがって、同一の磁性体粒子を使い続ける場合に、該磁性体粒子に蓄積されて残存する不要物質が次の工程で行われる反応や測定に悪影響を与える事態を防止し、高感度で高精度又は信頼性のある処理を行うことができる。

本発明では、2種類の磁性体粒子を用いる場合を説明したが、当該場合に限られることなく、2種類の磁性体粒子を用いた処理を繰り返すことによってさらに第3、第4…の磁性体粒子を用いることができる。

第十の発明は、第九の発明において前記目的物質は塩基配列断片を含むDNA等であり、前記第1磁性体粒子は表面が多孔性であり、前記解離用液は純水であり、前記第2磁性体粒子は、プローブ、ビオチン又はストレプトアビジン等がコーティング又は結合されたものであり、前記第1磁性体粒子から解離されたDNA等は、ピペットチップを用いて必要に応じてプライマーと混合させ、プライマーと反応したDNA等はPCRに入れてDNA等を増幅した後、該DNA等をビオチン化させ、ビオチン化した特定のDNA等を第2磁性体粒子に捕獲させて分離し、分離後に化学発光、蛍光等の反応物質を結合させて測定する工程を含むものである。

第十一の発明は、第九の発明において、前記試料が血清等の体液成分であり、目的物質は抗原又は抗体であり、前記第1磁性体粒子又は第2磁性体粒子には、前記目的物質と直接に又は他の1又は2以上の中間物質を介して間接に特異的に反応する物質がコーティング又は結合されているものである。

以上のように構成された各発明によって、少なくとも2種類の磁性体粒子を組み合わせるだけで、細胞の捕獲、細胞核の溶解、蛋白質の溶解、DNA等の抽出、DNA等の単離およびDNA等の標識若しくは測定等の一連の作業を自動的に、かつ、一貫して達成する

ことができる。

また、各発明にあっては、上記２種類以上の磁性体粒子を用いる第１の原理と本出願人が先に提案した分注機を利用した磁性体の脱着制御の原理とを組み合わせることで、さらに効率的なDNA等の全自動解析を達成することができ、しかも、完全なコンタミネーションの防止を達成することができる。

さらに、各発明にあっては、２種類以上の磁性体粒子を制御することで、濃縮、攪拌、遠心分離、透析等の処理をも含め一貫して行うことができるので、機構・制御が非常に容易であるため装置規模を縮小化しコストを大幅に低減することができる。

またさらに、各発明にあっては、複数種類の磁性体粒子を使い分けて、各作業工程で最適な磁性体粒子を選択することによって、多くの作業工程からなる種々の処理を、効率良く、信頼性良く、且つ確実に、迅速に実行できるとともに、多様性及び汎用性が高い。

15

図面の簡単な説明

図１は、この発明の実施の位置形態例に係るDNA等の抽出・解析装置の概略的な構成を示すブロック図である。

図２は、同装置の作動ステップを順に示す作業フロー説明図である。

20

本発明を実施する最良の形態

以下、この発明の第一の実施の形態例を、添付図面に基づき詳細に説明する。

25 図１は、２種類の磁性体微粒子を利用し、これら磁性体微粒子を本出願人が先に提案した原理と組み合わせてDNA解析装置を構成した場合を例示しており、図２は、このDNA解析装置による作業工程が概略的に示されている。勿論、この発明は、目的物質として、上記DNAだけではなく、RNA、mRNA、プラスミド、ウィ

ルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の抽出若しくは解析等の処理にも適用することができる。

この形態例に係るDNA解析装置は、XYZ移動機構で昇降自在、かつ、水平移動自在なピペットノズルの先端部に着脱自在に装着
5 されるピペットチップ2が、図2に示すように、サンプリング、試薬分注、第1磁性体微粒子注入、DNA吸着、純水吸引、DNA捕獲、プライマー注入の作業を行なうように駆動制御され、このプライマーが注入された容器は、この後、PCR3で多段階加熱処理されてDNAの増殖が行なわれ、このDNA増殖作業が終了した後、
10 上記ピペットチップ2は、上記容器内に第2磁性体微粒子を注入し、次に、アルカリ処理液の注入、DNA洗浄液の吸引、吐出、化学発光、蛍光或は酵素呈色反応が行なわれるように駆動制御されている。

第1磁性体微粒子は、球形が均一、かつ、0.3～5ミクロン以下と微小である。また、該磁性体粒子はその表面が多孔質であったり、シリカゲルが混合された物質が多く使用されていて、表面への付着等により効率よくDNA等を結合して回収できるものである。

第2磁性体微粒子は、定量、測定反応を司るもので、特定の塩基
20 配列断片を捕獲する目的でプローブ、或は、磁性体微粒子の表面とDNA等との間でビオチン(Biotin)とストレプトアビジン(Streptavidin)との親和性の高い反応を利用するため、上記ビオチンまたはストレプトアビジンを磁性体微粒子にコーティングするとともに、ストレプトアビジン又はビオチン化されたDNA等が用いられる。

25

PCR3は、DNAの増殖を行なう公知の手法、装置であって、例えば、サンプルを96℃まで加熱した後、これを40℃まで冷却し、この後、再び96℃まで加熱し、40℃まで冷却する、という工程を複数回繰り返すように構成されている。

化学発光、蛍光或は酵素呈色等を利用して目的塩基配列断片の試料中の存在或は量を確認する測定装置は、例えば、PMTや分光光度計等の公知の微光量光学測定装置が用いられる。

次に、以上のように構成されてなるDNA解析装置によってDNAの解析を行なう工程を、図2に基づき説明する。

まず、ホモジナイズされたサンプルに必要試薬（SDSやプロテアーゼ）を分注して蛋白等を溶解させる（ステップa）。

この後、この蛋白等が溶解したサンプル試料に上記第1磁性体微粒子を注入して、該第1磁性体微粒子にサンプル試料中のDNA等を物理吸着等により結合させ捕獲する（ステップb）。

次に、所定のインキュベーションを経た後、上記容器中の試料を吸引して、該ピペットチップ2の外部に接離自在に配設された磁石Mがピペットチップ2の外周面に密着し、DNA等が捕獲された第1磁性体微粒子をピペットチップの内面に吸着させる（ステップc）。

次に、解離液として純水を吸引して第1磁性体微粒子に捕獲されたDNA等と第1磁性体微粒子とを解離させる（ステップd）。このとき、上記磁石Mは、ピペットチップ2から離れた位置、即ち、吸引された試料に磁力の影響が及ばない位置まで離れるように駆動制御される。

この後、上記磁石Mを再びピペットチップ2の外周面に密着させて、第1磁性体微粒子のみをピペットチップ2の内面に吸着させた状態でDNA等と純水を分離させ、DNA等のみを取り出し回収する（ステップe）。この後、上記第1磁性体微粒子は廃棄される。

25

次に、上記ピペットチップ2は、分離されたDNA等をプライマーと混合させる（ステップf）。

この後、上記プライマーと反応したDNA等は、上記PCR3に入れられて所定の温度加熱（96℃）と冷却（40℃）が繰り返さ

れてDNAの増殖が行なわれる（ステップg）。

次に、上記ピペットチップ2は、PCR3で増幅されたDNA試料を、例えばビオチン化によって標識をつけ、ビオチンと特異的に親和性の良いストレプトアビジンがコーティングされた前記第2磁性体微粒子を注入する（ステップh）。

この後、上記ピペットチップ2は、このDNA試料中にアルカリ処理液を分注し（ステップi）、次に、このアルカリ処理されたDNA試料を吸引し、上記磁石Mによって該第2磁性体微粒子をピペットチップ2の内面に吸着させた後、洗浄水の吸引・吐出して第2磁性体微粒子を洗浄し、特定の塩基配列断片を単離する（ステップj）。

次に、この単離した塩基配列断片に、化学発光、蛍光或は酵素呈色反応物質をDNA等、或は、DNAと結合した粒子と結合させ（ステップk）、PMTや分光光度計等の公知の微光量光学測定装置で目的の塩基配列断片の有無を測定し、或は、その量を測定する（ステップl）。

以上説明したように、本実施の形態例では、第1磁性体微粒子として多孔質のものをを用いることにより純水によって容易に解離させやすいものを選び、第2磁性体微粒子としては強固に結合して目的物質を効率的に捕獲するものを選んでいく。したがって、第1磁性体微粒子を効率良く解離して目的物質を回収して測定を効率良く行うことができる。また、第1磁性体微粒子を廃棄して第2磁性体微粒子に置き換えることによって、第1磁性体微粒子に付着して残存する異物を排除することができるので信頼性のある測定を行うことができる。

次に、本発明を免疫血清反応に適用した第二の実施の形態例について説明する。

第一の実施の形態例において、DNAの代わりに抗原、第1磁性体微粒子について第一抗体結合磁性体微粒子を用い、プライマーや

PCRを用いずに第二抗体を用い、標識化のために第三抗体を用い、純水による解離の代わりに他の解離剤を用いるとともに、前記標識化した第三抗体と特異的に反応する物質を結合又はコーティングした第2磁性体微粒子を用いることによって免疫血清反応を実現することができる。

本実施の形態例を血清中CEA（ガン胎児性）抗原検出に適用した場合について説明する。

第1の工程で、第一反应用マイクロプレートの各プレートホールに、予め、第1磁性体微粒子として抗DNPマウス抗体結合磁性体微粒子（第一抗体）と、該抗DNPマウス抗体と特異的に反応するDNPを有するDNP及びビオチン化抗CEAマウス抗体（第二抗体）、発光基質と反応して発光するALP（アルカリフォスファターゼ）標識抗CEAマウス抗体（第三抗体）、解離剤としてDNP-リジン、及び第2磁性体微粒子としてストレプトアビジン結合磁性体微粒子を各試薬チップで各プレートホールに分注しておく。尚、抗原抗体反応によって結合する場合の解離剤としては、該抗原又は抗体と同種の抗原又は抗体を含む物質を用いることができる。

第2の工程で、反应用チップで血清サンプルを吸引して反应用容器に入れ、第1磁性体微粒子である前記抗DNPマウス抗体結合磁性体微粒子、及び第二抗体であるDNA及びビオチン化抗CEAマウス抗体とをピペットチップで前記反应用容器に分注して混合攪拌した後インキュベーションを行う。すると、血清中に含有する目的物質である前記CEA抗原は、直接第1磁性体微粒子とは結合しないが、DNP及びビオチン化抗CEAマウス抗体と特異的に反応して結びつくとともに、該DNP及びビオチン化抗CEAマウス抗体が前記第1磁性体微粒子の抗DNPマウス抗体と特異的に反応して結びつく。したがって、目的物質である前記CEA抗原は、第二抗体を介して第一抗体がコーティングされている第1磁性体微粒子と結合し捕獲される。

第3の工程で、インキュベーションの後、ピペットチップの側面に磁石を接近させること等によって、内部に磁場を及ぼすことによって前記CEA抗原を捕獲した第1磁性体微粒子をピペットチップの内面に吸着すること等により分離して残液を除去した後、分離した該第1磁性体微粒子をALP標識抗CEAマウス抗体と混合攪拌した後インキュベーションを行う。これによって、該ALP標識抗CEAマウス抗体は、前記第1磁性体微粒子に捕獲された目的物質たるCEA抗原と特異的に反応して結合する。

第4の工程で、インキュベーションの後、該CEA抗原及び該ALP標識抗CEAマウス抗体を捕獲した第1磁性体微粒子をピペットチップの内部に磁場を及ぼすことによって内面に吸着させることによって分離し、その残液を除去した後、解離剤であるDNP-リジンの溶液を吸引して該第1磁性体微粒子から捕獲したCEA抗原、ALP標識抗CEAマウス抗体、並びに、DNP及びビオチン化抗CEAマウス抗体の組合体を解離した後、第1磁性体微粒子を分離して除去した後、残液にピペットチップを用いて前記第2磁性体微粒子であるストレプトアビジン結合磁性体微粒子を注入し混合攪拌する。すると、前記組合体のうちビオチン化抗CEAマウス抗体と第2磁性体微粒子にコーティングされたストレプトアビジンとが特異的に反応し該組合体は第2磁性体微粒子に捕獲される。

第5の工程で、インキュベーションの後、該組合体を捕獲した第2磁性体微粒子を前記ピペットチップに磁場を及ぼすことによって分離し、残液を除去した後、発光基質AMP-PDを添加することによって前記組合体を形成するALP標識抗CEAマウス抗体に作用して発光させ、発光量を測定することによって、CEA抗原を解析することができる。

以上示したように、本実施の形態例によると、複数種類（ここでは2種類）の異なる磁性体微粒子を順次交換して用いることによって、各作業で最適な磁性体微粒子を選択して各作業の効率を高める

- とともに、作業への悪影響を排除することができる。例えば、上記例では、第1磁性体微粒子にコーティングされた物質は解離剤で容易に捕獲物質を解離することができるものであり、第2磁性体微粒子は、強固な結合によって捕獲物質を保持し、測定を効率良く行うことができる。また、第1磁性体微粒子のコーティング物質が測定等の後の作業に与える影響を排除している。また、本実施の形態例によれば、先行する作業工程で使用された種々の不要な物質の残存を、容易、且つ、十分に除去することができる。これによって、高感度で信頼性良い後の測定等の作業工程を保証することができる。
- 10 尚、第一の実施の形態例では、ビオチン化させたDNAに対してストレプトアビジンがコーティングされた第2磁性体微粒子に捕獲させたものであるが、本発明は当該場合に限られるものではなく、例えば、プローブを用いたハイブリダイゼーション法によってDNAの分析測定等の処理を行うことができる。さらには、前記磁性体微
- 15 粒子にオリゴdTをコーティングさせ、抽出したRNAを溶解した液に、該磁性体微粒子を混合することによってmRNAを捕獲し、捕獲したmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成するようにしても良い。さらに、ビオチン化したmRNAにcDNAをハイブリダイズさせた液に、ストレプトアビジンをコーティングした磁
- 20 性体微粒子を分注させて、ビオチン化したmRNAを該磁性体微粒子に結合させる。その後、磁石を接近させることによってハイブリダイズしたcDNAを該磁性体微粒子に捕獲させて回収させるようにしても良い。

上記形態例では、この2種類の磁性体微粒子を用いてDNA等の

25 解析を行なう場合を例にとり説明したが、本発明にあってはこれに限定されるものではなく、3種類以上の磁性体微粒子を用いて上記解析作業を行なうように構成することもできることは勿論である。例えば、第一の実施の形態例で、細胞を抽出する際にも、生体組織から切り出した組織小切片をホモジナイズさせた後、細胞を抽出す

- る際にも、他の磁性体微粒子にリガンド又は受容体をコーティング等することによって該磁性体微粒子を用いて細胞の抽出を行うことができる。以上の例は主として生体高分子についての処理に適用したが、本発明はこれらの物質に適用する場合に限られることなく、
- 5 例えば、有機又は無機を含む化学物質の処理に適用できることは言うまでもない。

請 求 の 範 囲

1. 細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス、
若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出、
回収、単離、増幅、標識、分析又は測定等の作業からなる処理を、
5 その作業目的に適合した複数種類の磁性体粒子を利用して自動的に
行なうことを特徴とする複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子
、微生物又は物質の処理方法。
2. 前記細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィル
ス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出
10 、回収、単離、増幅、標識、分析又は測定等の作業からなる処理は
、分注機のピペットノズル先端部に着脱自在に装着されたピペット
チップで行なうことを特徴とする請求項1に記載の複数種類の磁性
体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。
3. 前記ピペットチップは、試料の吸引若しくは吐出と磁石の接
15 離制御により生体高分子、微生物或は特定の物質が結合した磁性体
粒子を、捕獲、抽出、回収、単離、増幅、標識、分析又は測定等の
各作業工程間の移送を行うことを特徴とする請求項2に記載の複数
種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法
。
- 20 4. 細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若
しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質を、分注機のピペ
ットノズル先端部に着脱自在に装着されたピペットチップを利用し
て磁性体粒子に結合させて、細胞の捕獲、細胞核溶解若しくは蛋白
質溶解等の精製処理を行なうことで、DNA、RNA若しくはmR
25 NAを抽出し、次に、プローブ、ビオチン若しくはストレプトアビ
ジンがコーティングされた他の磁性体粒子が特定の塩基配列断片を
単離させることを特徴とする複数種類の磁性体粒子を用いる生体高
分子、微生物又は物質の処理方法。
5. 前記複数の磁性体粒子を利用した細胞、DNA、RNA、m

RNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出、回収、単離、増幅、標識、分析又は測定等の各作業は、免疫反応又は相補的DNA等の特異的親和性物質を介して行うことを特徴とする請求項1乃至請求項4のいずれかに記載の複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。

6. 前記複数の磁性体粒子を利用した細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出若しくは単離作業工程の間に、DNA、RNA若しくはmRNA等の増幅工程を組み入れたことを特徴とする請求項4に記載の複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。

7. 前記複数の磁性体粒子を利用した細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出若しくは単離作業工程の後に、単離された特定の塩基配列断片等の生体高分子、微生物若しくは物質を化学発光や蛍光若しくは酵素呈色にて、その特定の塩基配列断片等の有無、生体高分子、微生物若しくは物質を免疫反応等を介して測定することを特徴とする請求項4乃至請求項6のいずれかに記載の複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。

8. 細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質を、分注機のピペットノズル先端部に着脱自在に装着されたピペットチップを利用して磁性体粒子に結合させて、細胞の捕獲、細胞核溶解、蛋白質溶解若しくは免疫反応等の精製処理を行なうことで、DNA、RNA若しくはmRNA等を抽出し、次に、必要に応じて抽出されたDNA、RNA若しくはmRNA等については増幅させた後、ピペットチップを利用して抗体、プローブ、ビオチン若しくはストレプトアビ

ジンがコーティングされた他の磁性体粒子で特定のDNA、RNA若しくはmRNA等を単離させ、次に、この単離されたDNA、RNA若しくはmRNA等を、化学発光、蛍光若しくは酵素呈色にて、その特定の塩基配列断片等の有無や量等を測定することを特徴とする請求項4乃至請求項7のいずれかに記載の複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。

9. 試料中に第1磁性体粒子をピペット手段により混合又は攪拌させることによって試料中の目的物質を第1磁性体粒子に結合させて捕獲する工程と、目的物質が捕獲された第1磁性体粒子をピペット手段によって分離し、その残液を除去する工程と、磁性体粒子から前記目的物質を解離するための解離用液と前記第1磁性体粒子を混合又は攪拌することによって目的物質を第1磁性体粒子から解離させる工程と、該第1磁性体粒子を除去する工程と、ピペット手段による混合又は攪拌によって該目的物質を第2磁性体粒子に結合させて捕獲する工程と、該第2磁性体粒子をピペット手段によって分離する工程とを少なくとも含むことを特徴とする複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。

10. 前記目的物質は塩基配列断片を含むDNA等であり、前記第1磁性体粒子は表面が多孔性であり、前記解離用液は純水であり、前記第2磁性体粒子は、プローブ、ビオチン又はストレプトアビジン等がコーティング又は結合されたものであり、前記第1磁性体粒子から解離されたDNA等は、ピペットチップを用いて必要に応じてプライマーと混合させ、プライマーと反応したDNA等はPCRに入れてDNA等を増幅した後、該DNA等をビオチン化させ、ビオチン化した特定のDNA等を第2磁性体粒子に捕獲させて分離し、分離後に化学発光、蛍光等の反応物質を結合させて測定する工程を含むことを特徴とする請求項9に記載の複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。

11. 前記試料が血清等の体液成分であり、目的物質は抗原又は

- 抗体であり、前記第 1 磁性体粒子又は第 2 磁性体粒子には、前記目的物質と直接に又は他の 1 又は 2 以上の中間物質を介して間接に特異的に反応する物質がコーティング又は結合されていることを特徴とする請求項 9 記載の複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、
- 5 微生物又は物質の処理方法。

[1997年7月28日(28.07.97)国際事務局受理:出願当初の請求の範囲1及び2は補正された;他の請求の範囲は変更なし。(4頁)]

1. (補正後) 細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス、若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出、回収、単離、増幅、標識、分析又は測定等の複数の作業
5 からなる一連の処理を、生体高分子等の目的物質に対して、その作業目的に適合した複数種類の磁性体粒子を順次結合又は解離させることによって自動的に行なうことを特徴とする複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。
2. (補正後) 前記細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミ
10 ド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出、回収、単離、増幅、標識、分析又は測定等の複数の作業からなる一連の処理は、分注機のピペットノズル先端部に着脱自在に装着されたピペットチップで行うことを特徴とする請求項1に記載の複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質
15 の処理方法。
3. 前記ピペットチップは、試料の吸引若しくは吐出と磁石の接離制御により生体高分子、微生物或は特定の物質が結合した磁性体粒子を、捕獲、抽出、回収、単離、増幅、標識、分析又は測定等の各作業工程間の移送を行うことを特徴とする請求項2に記載の複数
20 種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。
4. 細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質を、分注機のピペットノズル先端部に着脱自在に装着されたピペットチップを利用して
25 て磁性体粒子に結合させて、細胞の捕獲、細胞核溶解若しくは蛋白質溶解等の精製処理を行なうことで、DNA、RNA若しくはmRNAを抽出し、次に、プローブ、ビオチン若しくはストレプトアビジンがコーティングされた他の磁性体粒子が特定の塩基配列断片を単離させることを特徴とする複数種類の磁性体粒子を用いる生体高

分子、微生物又は物質の処理方法。

5. 前記複数の磁性体粒子を利用した細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出、回収、単離、増幅、標識、分析又は測定等の各作業は、免疫反応又は相補的DNA等の特異的親和性物質を介して行うことを特徴とする請求項1乃至請求項4のいずれかに記載の複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。

6. 前記複数の磁性体粒子を利用した細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出若しくは単離作業工程の間に、DNA、RNA若しくはmRNA等の増幅工程を組み入れたことを特徴とする請求項4に記載の複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。

7. 前記複数の磁性体粒子を利用した細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質の捕獲、抽出若しくは単離作業工程の後に、単離された特定の塩基配列断片等の生体高分子、微生物若しくは物質を化学発光や蛍光若しくは酵素呈色にて、その特定の塩基配列断片等の有無、生体高分子、微生物若しくは物質を免疫反応等を介して測定することを特徴とする請求項4乃至請求項6のいずれかに記載の複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。

8. 細胞、DNA、RNA、mRNA、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生体高分子、微生物若しくは物質を、分注機のピペットノズル先端部に着脱自在に装着されたピペットチップを利用して磁性体粒子に結合させて、細胞の捕獲、細胞核溶解、蛋白質溶解若しくは免疫反応等の精製処理を行なうことで、DNA、RNA若しくはmRNA等を抽出し、次に、必要に応じて抽出されたDNA

、RNA若しくはmRNA等については増幅させた後、ピペットチップを利用して抗体、プローブ、ビオチン若しくはストレプトアビジンがコーティングされた他の磁性体粒子で特定のDNA、RNA若しくはmRNA等を単離させ、次に、この単離されたDNA、RNA若しくはmRNA等を、化学発光、蛍光若しくは酵素呈色にて、その特定の塩基配列断片等の有無や量等を測定することを特徴とする請求項4乃至請求項7のいずれかに記載の複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。

9. 試料中に第1磁性体粒子をピペット手段により混合又は攪拌させることによって試料中の目的物質を第1磁性体粒子に結合させて捕獲する工程と、目的物質が捕獲された第1磁性体粒子をピペット手段によって分離し、その残液を除去する工程と、磁性体粒子から前記目的物質を解離するための解離用液と前記第1磁性体粒子を混合又は攪拌することによって目的物質を第1磁性体粒子から解離させる工程と、該第1磁性体粒子を除去する工程と、ピペット手段による混合又は攪拌によって該目的物質を第2磁性体粒子に結合させて捕獲する工程と、該第2磁性体粒子をピペット手段によって分離する工程とを少なくとも含むことを特徴とする複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。

10. 前記目的物質は塩基配列断片を含むDNA等であり、前記第1磁性体粒子は表面が多孔性であり、前記解離用液は純水であり、前記第2磁性体粒子は、プローブ、ビオチン又はストレプトアビジン等がコーティング又は結合されたものであり、前記第1磁性体粒子から解離されたDNA等は、ピペットチップを用いて必要に応じてプライマーと混合させ、プライマーと反応したDNA等はPCRに入れてDNA等を増幅した後、該DNA等をビオチン化させ、ビオチン化した特定のDNA等を第2磁性体粒子に捕獲させて分離し、分離後に化学発光、蛍光等の反応物質を結合させて測定する工程を含むことを特徴とする請求項9に記載の複数種類の磁性体粒子

を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。

- 1 1. 前記試料が血清等の体液成分であり、目的物質は抗原又は抗体であり、前記第 1 磁性体粒子又は第 2 磁性体粒子には、前記目的物質と直接に又は他の 1 又は 2 以上の中間物質を介して間接に特
- 5 異的に反応する物質がコーティング又は結合されていることを特徴とする請求項 9 記載の複数種類の磁性体粒子を用いる生体高分子、微生物又は物質の処理方法。

条約19条に基づく説明書

① 請求の範囲の第1、3、4、5、11項について

請求の範囲の第1項等は、目的物質に対し複数種類の磁性体粒子を順次結合又は解離することによって、複数の作業からなる一連の処理を行うことを明確にしたものである。

引用例1（特表平6-510363号公報）、引用例2（特開平6-300754号公報）、引用例3（特開平6-294796号公報）、及び引用例6（特開平8-320274号公報）はいずれも、1種類の目的物質（生物学的材料、検体、mRNA等）に注目した場合には1種類の磁性体粒子にしか結合していない。磁性体粒子からの解離はもちろん、さらに解離した目的物質を別の磁性体粒子に結合して処理する点についての開示はない。引用例1、2、3は磁性体粒子は目的物質を識別するためにのみ用いられるものである。引用例6は目的物質を1種類の磁性体粒子に結合させたままで処理を行うものである。

本発明は、各引用例に記載された発明と構成上異なるので新規性がある。本発明は、目的物質に対して複数種類の磁性体粒子を順次結合又は解離させるようにしているため、複数の作業からなる複雑な処理も、自動的に且つ一貫して達成することができる。したがって装置規模を縮小化し、コストを削減することができる。多くの作業工程からなる種々の処理を、効率良く、信頼性良く、確実に、且つ迅速に実行することができるという各引用例に記載された発明にはない格別な効果を奏するので進歩性がある。

25 ② 請求の範囲の第2項について

請求の範囲の第1項で示した目的物質に対し複数種類の磁性体粒子を順次結合又は解離する処理を、着脱自在のピペットチップを用いて行う点を明確にしたものである。

引用例1、2、3、6については①と同様である。

引用例 4（特開平 8－2 9 4 2 5 号公報）には、着脱自在のピペットチップを用いる点の記載はない。

5 本発明は、ピペットチップを用いることによって、さらに効率的な処理を行うことができ、しかも、完全なクロスコンタミネーションの防止を図ることができるという各引用例に記載された発明にはない格別な効果を奏するので進歩性がある。

③ 請求の範囲の第 6、7、8、9、10 項について

10 請求の範囲の第 6 項等では、ピペット手段又はピペットチップを用いて、目的物質に対して複数種類の磁性体粒子が順次結合又は解離する処理を行う点を明確にしたものである。

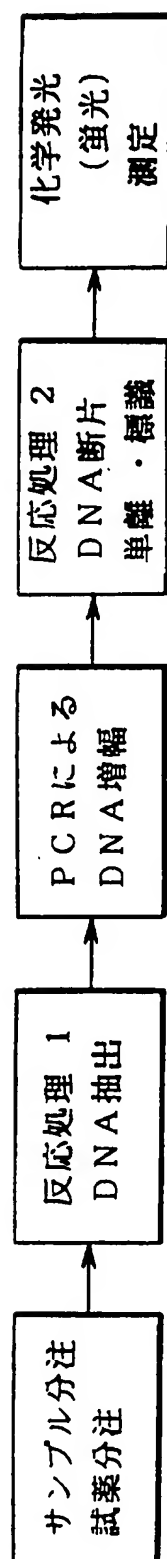
引用例 1、2、3、6 については①と同様である。引用例 4 については②と同様である。

15 引用例 5（特開平 8－9 9 5 7 号公報）には、ヒト抗体、ストレプタビシンー磁気粒子等をモジュール中で懸濁し、インキュベートして磁石 20 で保持する等の記載はあるが、1 種類の目的物質当たりに複数種類の磁性体粒子を用いる点、及び、ピペットチップを用いる点の記載はない。

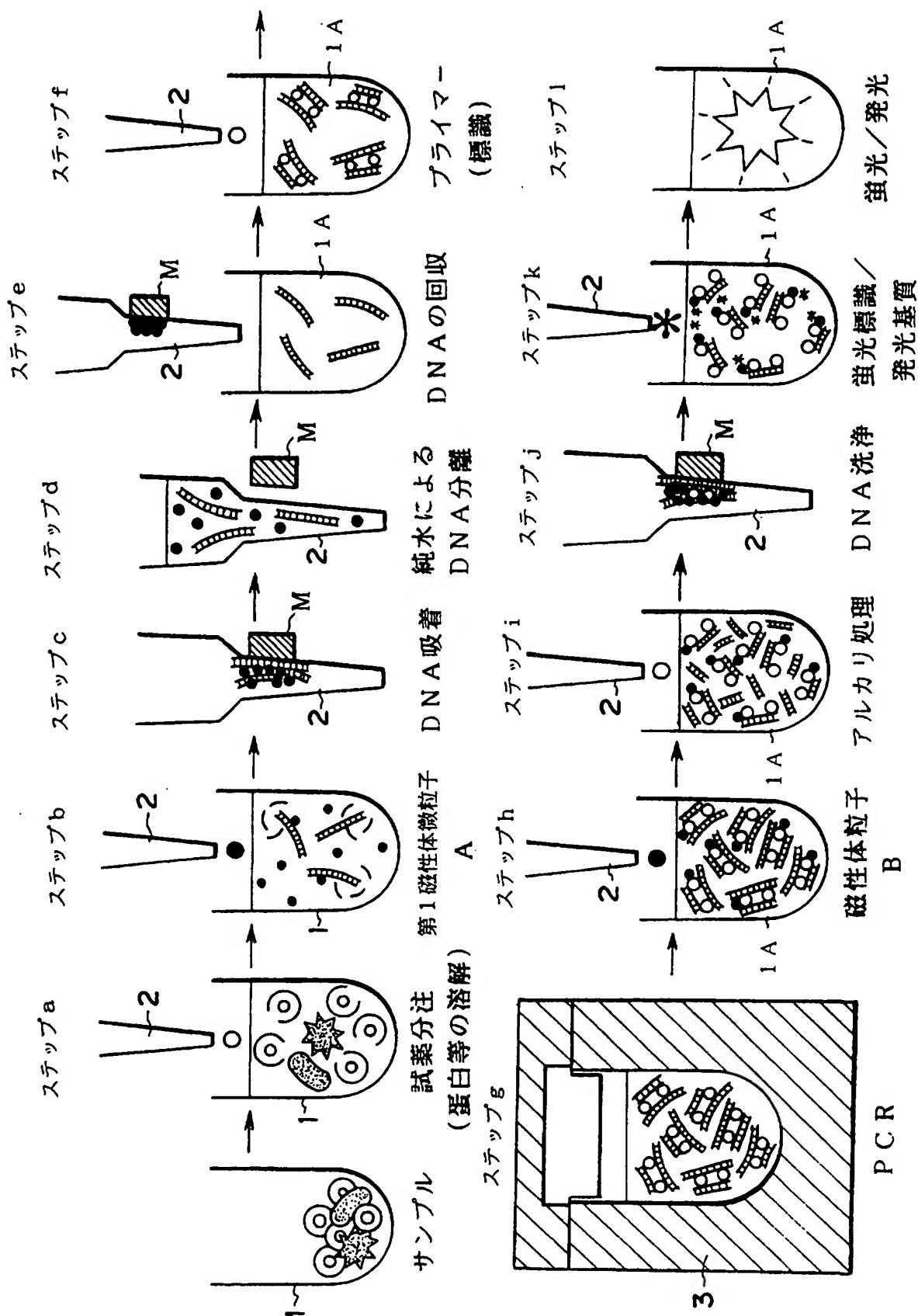
20 本発明は、複数の磁性体粒子を用いた処理を、効率的に行うとともに、クロスコンタミネーションの防止を実現することができるという各引用例に記載された発明にはない格別な効果を奏するので進歩性がある。

以上

第 1 図



第 2 図



- 1 容器
- 2 ピペットチップ
- 3 PCR

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00515

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/10, C12Q1/02, C12Q1/68, C12Q1/70, G01N33/53,
B03C1/015, C12N13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/10, C12Q1/02, C12Q1/68, C12Q1/70, G01N33/53,
B03C1/015, C12N13/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$	JP, 06-510363, A (Dekalb Plant Genetics), November 17, 1994 (17. 11. 94), (Refer to abstract; Table 1; page 9, upper left column; page 14, lower left column) & WO, 92/08133, A & AU, 9189511, A & US, 5508164, A	$\frac{1}{2 - 11}$
$\frac{X}{Y}$	JP, 06-300754, A (Hitachi, Ltd.), October 28, 1994 (28. 10. 94), (Refer to abstract) (Family: none)	$\frac{1}{2 - 11}$
Y	JP, 06-294796, A (Hitachi, Ltd.), October 21, 1994 (21. 10. 94), (Refer to abstract; Fig. 2) (Family: none)	1 - 11
Y	JP, 08-029425, A (Boehringer Mannheim GMBH), February 2, 1996 (02. 02. 96), (Refer to page 4, paragraphs (0020) to (0027); Fig. 5) & EP, 687505, A & DE, 4421058, A	2 - 11
Y	JP, 08-009957, A (Boehringer Mannheim GMBH),	6-8, 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 16, 1997 (16. 05. 97)

Date of mailing of the international search report

May 27, 1997 (27. 05. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00515

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PY	January 16, 1996 (16. 01. 96), (Refer to page 7, paragraph (0067) to page 8, paragraph (0069)) & EP, 687502, A & DE, 4420732, A JP, 08-320274, A (Precision System Science Co., Ltd.), December 3, 1996 (03. 12. 96) & WO, 96/29602, A & EP, 763739, A	1 - 11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

IntCl¹ C12N15/10, C12Q1/02, C12Q1/68, C12Q1/70, G01N33/53,
B03C1/015, C12N13/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

IntCl¹ C12N15/10, C12Q1/02, C12Q1/68, C12Q1/70, G01N33/53,
B03C1/015, C12N13/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
$\frac{X}{Y}$	JP, 06-510363, A (Dekalb Plant Genetics) 17. 11月. 1994 (17. 11. 94) (要約、表1、第9頁左上欄、第14頁左下欄 参照) &WO, 92/08133, A &AU, 9189511, A &US, 5508164, A	$\frac{1}{2-11}$
$\frac{X}{Y}$	JP, 06-300754, A (株式会社 日立製作所) 28. 10月. 1994 (28. 10. 94) (要約 参照) (ファミリーなし)	$\frac{1}{2-11}$

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 05. 97

国際調査報告の発送日

27.05.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤田 節



4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 06-294796, A (株式会社 日立製作所) 21. 10月. 1994 (21. 10. 94) (要約、第2図 参照) (ファミリーなし)	1-11
Y	J P, 08-029425, A (Boehringer Mannheim GmbH) 2. 2月. 1996 (02. 02. 96) (第4頁 [0020] ~ [0027] 欄、第5図 参照) &EP, 687505, A &DE, 4421058, A	2-11
Y	J P, 08-009957, A (Boehringer Mannheim GmbH) 16. 1月. 1996 (16. 01. 96) (第7頁 [0067] ~ 第8頁 [0069] 欄 参照) &EP, 687502, A &DE, 4420732, A	6-8, 10
PY	J P, 08-320274, A (プレシジョン・システム・サイエンス株式会社) 3. 12月. 1996 (03. 12. 96) &WO, 96/29602, A &EP, 763739, A	1-11

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.